

Isolation of Antioxidative Products and Evaluation of the Pancreatic Lipase Inhibitory Activity of (+)-Catechin via Thermal Treatment

Ah Young Son¹, Jin Tae Lee¹, O Jun Kwon², Taewan Kim³, and Tae Hoon Kim^{4*}

¹Department of Cosmetic Pharmacology, Daegu Haany University, Gyeongsan 712-715, Korea

²Daegyeong Institute for Regional Program Evaluation, Gyeongsan 712-210, Korea

³Department of Food Science and Biotechnology, Andong National University, Andong 760-749, Korea

⁴Department of Herbal Medicinal Pharmacology, Daegu Haany University, Gyeongsan 712-715, Korea

(+)-Catechin 가열처리에 의한 항산화 활성물질 분리 및 pancreatic lipase 저해활성 평가

손아영^{1†} · 이진태¹ · 권오준² · 김태완³ · 김태훈^{4†}

¹대구한의대학교 화장품약리학과, ²대경지역사업평가원, ³안동대학교 식품생명공학과,
⁴대구한의대학교 한약재약리학과

Abstract

Thermal processing of (+)-catechin was carried out at 121°C for different reaction times (1, 2, 3, 6, and 12 h). The reacted products, compounds (1) and (2), were isolated and quantified via HPLC analysis. The antioxidant properties of processed (+)-catechin and its isolated compounds for different reaction time was measured via radical scavenging assays using DPPH and ABTS⁺ radicals. Additionally, the anti-obesity efficacy of the thermal treated (+)-catechin was evaluated via porcine pancreatic lipase assay. The reacted (+)-catechin for 3 h had a slightly higher antioxidant capacity than that the parent (+)-catechin. Products 1 and 2, which were isolated from the reacted mixture during 3 h, showed an antioxidant capacity, and these two compounds may be responsible for the antioxidant capacity of processed (+)-catechin. Simple thermal treatment of (+)-catechin can be used to produce (+)-epicatechin (1) and procatechuic acid (2) with enhanced antioxidant and anti-adipogenic effects.

Key words : (+)-catechin, thermal treatment, DPPH, ABTS+, pancreatic lipase

서 론

(+)-Catechin은 flavan-3-ol이라 불리어지는 화합물로서 폴리페놀의 대표적인 그룹에 속하며, 항산화 활성을 시작으로 하여 항염증 활성 등의 광범위한 효능을 나타내는 것으로 알려져 있다(1-5). 이들 관련 화합물은 녹차 및 과일 등의 다양한 천연 소재로부터 광범위하게 존재하는데, 특히 녹차에는 (-)-epicatechin (EC), (-)-epicatechin 3-O-gallate (ECG), (-)-epigallocatechin 3-O-gallate (EGCG) 등이 14% 이상의 함량으로 존재하여 다양한 생리활성을 나타내는 것이 알려져 있으며 이들 화합물의 함량은 녹차의 재배

지역 및 종류와 밀접한 관계가 있음이 밝혀졌다(6). (+)-Catechin은 *Uncaria* 및 *Theobroma*속 식물 등에 주로 존재하며 식품 등으로부터 일상적인 섭취를 통하여 질병 예방과 밀접한 관련이 있으며 쓴맛을 나타낸다(7,8). 최근에는 catechin 단량체는 인간 혈장에서 글루코론산, 황산, 메칠기 등과 중합체를 형성하여 소장과 간에서 대사 및 흡수 되는 것이 보고되었다(9).

최근 생활환경 및 식생활 패턴의 변화 등으로 현대인들은 생체조직의 노화와 관련된 각종 퇴행성 질환 및 생활 습관성 질병이 사회적 문제로서 주목을 받고 있으며 그 원인이 활성산소에 기인된 것으로, superoxide, nitric oxide, nitrogen dioxide, hydroxyl, peroxynitrite 등과 같은 활성 산소 종들은 인간의 대사과정 중에 끊임없이 발생되어 노화 및 관련 질병의 주요 인자로 작용하고 있다(10,11). 현재

*Corresponding author. E-mail : skyey7@dhu.ac.kr
Phone : 82-53-819-1371, Fax : 82-53-819-1339

널리 사용되고 있는 항산화제로서는 butylated hydroxy anisol (BHA) 및 butylated hydroxy toluene (BHT) 등의 합성 항산화제이며, 이들을 50 mg/kg/day 이상의 고용량으로 장기간 복용 시 지질대사의 불균형과 암을 유발시킬 수 있기 때문에 사용을 제한을 권고하고 있는 상황이다(12). 이러한 합성 항산화제를 대체할 수 있는 우수한 소재의 개발이 지속적으로 요구되고 있는 실정이며(13), 기능성 소재물질에 관한 탐색 연구는 주로 민간요법이나 한방에서 이미 효능이 검증된 소재를 활용하고 있으며, 식이가 가능하고 부작용이 적은 천연물을 이용한 연구가 활발히 이루어지고 있다(14).

비만치료와 관련하여 일반적으로 식사 및 운동이 가장 적절한 방법으로 인식되고 있으나 최근에는 식욕억제제, 열 생산 촉진제, 지방흡수 억제제의 개발이 진행되어 비만 치료제로서 이들 물질의 유용성이 주목을 받고 있으며, 그 중에서도 지방분해효소 저해제(pancreatic lipase inhibitor)가 관심을 받고 있다. Pancreatic lipase는 triglyceride를 2-monoacylglycerol과 fatty acid로 분해하는 key enzyme으로 작용한다(15). 대표적인 pancreatic lipase inhibitor는 *Streptomyces toxytricini*로부터 유래된 lipstatin의 유도체인 tetrahydrolipstatin (orlistat)으로서, 현재 항비만 의약품으로서 시판중이며 섭취된 지방의 약 30%를 저해할 정도로 효능이 가장 우수한 것으로 알려져 있다(16,17). 그러나 이와 같은 효능에도 불구하고 orlistat은 위장장애, 과민증, 담즙분비장애, 지용성 비타민 흡수억제 등의 부작용이 있는 것으로 알려져 있다(18). 최근에는 천연소재로부터 pancreatic lipase 저해제 개발을 위한 연구가 활발하게 진행되고 있으며(19), 길경(*Platycodon grandiflorum*), 세이지(*Salvia officinalis*), 우롱차로부터 지방분해 효소를 억제하는 활성성분이 보고되었다(20). 본 연구팀에서도 천연물 유래의 항비만 선도물질 개발의 일환으로 천연소재 및 천연물에 생물전환기법을 적용하여 pancreatic lipase 저해제를 분리하여 그 효능에 대해 보고하였다(21-24). 본 연구에서는 천연소재의 생물전환법을 통한 물질의 구조변환연구의 일환으로서 순수물질인 (+)-catechin에 열을 가하여 화합물의 구조변환 및 생리활성증강을 목표로 한 연구를 수행하여 항산화 활성물질 및 항비만 효능이 상승하는 것을 확인하였으므로 그 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

시약

본 실험에서 사용된 시약으로 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS), 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), porcine pancreatic lipase 및 (+)-catechin은 Sigma-Aldrich Chemical Co (St Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였

고, 그 외에 사용된 용매 및 시약은 일급 이상의 등급을 사용하였다.

(+)-Catechin의 가열처리

순수한 (+)-catechin 1.0 g에 대해 1.0 L의 H₂O에 첨가하여 121 °C에서 0, 1, 2, 3, 6, 12 h 동안 가열처리하였고, 가열 처리후 얻어진 용액을 여과한 후, 감압 농축하여 얻어진 결과물(923 mg)에 대해 reversed-phase HPLC로 분석하였으며, 항산화 활성 평가로 이용된 DPPH 및 ABTS⁺ 라디칼에 대해서 (+)-catechin의 3 h 가열 반응물의 IC₅₀값이 각각 6.3±0.4 및 1.8±0.1 µg/mL로 가장 강한 활성을 나타내었으며, pancreatic lipase에 대해서도 3 h 가열 후 생성물이 377.1±11.1 µg/mL로 활성이 (+)-catechin 보다 다소 상승함을 확인하였다. 이상의 활성을 평가하기 위하여 물질 분리를 수행하였고 얻어진 물질을 활용하여 (+)-catechin 가열산물에 존재하는 이들 분리물질의 상대함량을 평가하였다.

DPPH 라디칼 소거능 측정

전자공여능은 Blois (25)의 방법에 따라 측정하였다. 각 시료용액에 2 mL에 0.2 mM의 희석한 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 용액 1 mL을 넣고 교반한 후 30분간 방치한 다음 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여능은 시료용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 차이를 백분율로 나타내었다.

ABTS⁺ 라디칼 소거능 측정

(+)-Catechin 가열처리물의 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) radical 소거능을 Re 등(26)의 방법을 변형하여 다음과 같이 측정하였다. 7 mM ABTS (in water)와 2.45 mM K₂O₈S₂동량을 혼합 후 실온, 암소에서 16시간 방치하여 라디칼의 생성을 유도한 후 ABTS⁺ 라디칼 용액을 희석하여 734 nm에서 흡광도 값이 1.2~1.3 정도가 되도록 희석하여 사용하였다. 희석한 ABTS⁺ 라디칼 용액 980 µL와 (+)-catechin 가열처리 시료 추출액 20 µL을 혼합하여 실온에서 15분간 반응시킨 후 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 대조물질로는 1 mM ascorbic acid를 사용하였으며 결과는 시료를 처리하지 않은 군에 대한 %로 표시하였다.

Pancreatic lipase 저해활성 측정

Pancreatic lipase 저해활성 측정은 Kim 등(27)이 행한 방법을 변형하여 실시하였다. 즉 enzyme buffer (10 mM MOPS, 1 mM EDTA, pH 6.8)에 porcine pancreatic lipase를 0.5 g/200 mL의 농도로 4°C를 유지하면서 용해한 후 4000 rpm으로 원심 분리를 하여 상층액을 사용하여 169 µL Tis buffer (100 mM Tris-HCl, 5 mM CaCl₂, pH 7.0)와 6 µL enzyme buffer를 혼합한다. 샘플은 DMSO로 용해하여 final

농도가 3%가 되도록 한 후 다양한 농도로 희석하여 사용한다. 기질용액으로 *p*-nitriphenyl butyrate (*p*-NPB)을 10 mM 이 되게 DMF에 용해한 후 enzyme과 sample을 먼저 37°C에서 15분 동안 shaking incubation 시킨 후 기질을 첨가하여 37°C에서 30분 동안 shaking incubation 시킨 후 405 nm에서 ELISA reader를 이용하여 흡광도를 측정하였다. Pancreatic lipase 저해활성은 시료용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

활성물질 분리 및 HPLC 분석

항산화 활성실험에서 활성의 상승을 나타낸 (+)-catechin 1.0 g을 121°C에서 3시간 가열한 결과물 (923 mg) 중 일부인 900 mg을 H₂O를 활용한 재결정화를 통하여 반응하지 않은 (+)-catechin을 제거한 후 317.3 mg에 대해 YMC gel ODS AQ 120S (1.1 cm i.d. x 36 cm)를 이용한 칼럼크로마토그래피를 수행하여 25% 용리액으로부터 (+)-epicatechin (1) (58.2 mg), H₂O 용리액으로 부터 protocatechuic acid (2) (1.5 mg)를 분리하였다(Fig. 1). 이동상 용매로는 1% HCOOH (solvent A)와 acetonitrile (solvent B)를 사용하여 gradient elution을 다음과 같이 수행하였다. 0-10 min, 100% A; 10-20 min, 100% B로 물질 분석 및 분리를 하였으며 이동상의 유속은 1.0 mL/min을 유지하였고 PDA detector는 280, 254, 220 nm에서 화합물을 검출하였다. (+)-Catechin 0, 1, 2, 3, 6, 12 h 가열처리물에 존재하는 화합물의 상대함량 평가시 (+)-catechin, (+)-epicatechin 및 protocatechuic acid를 표준화합물로 사용하였으며, 본 실험에 사용된 시약 및 기기로서, HPLC는 Shimadzu LC-10A를 사용하였고, fraction collector는 Advantec SF-160을 사용하였다. 1H NMR 등의 스펙트럼은 acetone-d₆ 용매를 이용하여 600 MHz FT-NMR spectrometer (Varian VNS600)로 측정하였으며, 추출 및 Column chromatography용 용매는 특급시약을 사용하였다. TLC plate는 Kiesel gel 60 F254 (Merck) 및 RP-18 (Whatman)을 사용하였다. 발색시약으로는 vanillin-sulfuric acid 시액,

10% sulfuric acid 시액을 사용하였고, TLC spot검출에는 UV lamp의 파장은 254 및 360 nm를 사용하였다. 흡광도 측정은 multiplate spectrophotometer (Infinite F200; Tecan Austria GmbH, Grödig, Austria)로 각 흡수대에 따른 흡광도를 측정하였다.

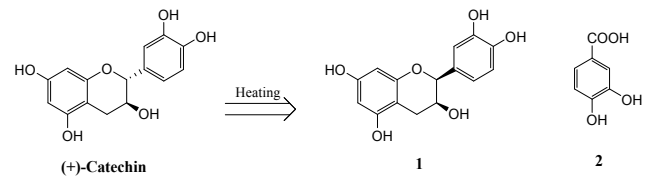


Fig. 1. Structures of thermal transformation products 1 and 2 of (+)-catechin

Compound 1 ((+)-epicatechin) White amorphous powder; $[\alpha]_D^{20} +51.5^\circ$ (c 0.2, MeOH); FAB-MS: m/z 291 [M+H]⁺; ¹H-NMR (600 MHz, Acetone-*d*₆+D₂O) δ_H 7.02 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-2'), 6.80 (1H, dd, $J = 8.4$ Hz, 1.8 Hz, H-6'), 6.77 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5'), 6.0 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-6), 5.89 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-8), 4.83 (1H, s, H-2), 4.17 (1H, s, H-3), 2.81 (1H, dd, $J = 16.8, 4.6$ Hz, H-4a), 2.68 (1H, dd, $J = 16.8, 3.0$ Hz, H-4b).

Compound 2 (protocatechuic acid) White amorphous powder; FAB-MS: m/z 155 [M+H]⁺; ¹H-NMR (600 MHz, Acetone-*d*₆+D₂O) δ_H 7.48(1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-2), 7.34(1H, dd, $J = 8.4$ Hz, 1.8 Hz, H-6), 6.71(1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5).

결과 및 고찰

DPPH 라디칼 소거활성

DPPH는 생체 내에 존재하는 라디칼은 아니지만 그 자체가 홀수전자를 갖고 있어 517 nm에서 강한 흡광도를 나타낸다. 따라서 항산화능이 있는 물질과 반응하게 되면 안정한 형태로 돌아가면서 흡광도 값이 감소한다(29). Table 1에서 나타난 것처럼 (+)-catechin을 121°C에서 0, 1, 2, 3, 6, 12 h 동안 가열처리한 결과물에 대하여 DPPH 라디칼 소거능을 평가한 결과, (+)-catechin의 3 h 가열결과물에서 가장 강한 활성인 IC₅₀값이 6.3±0.4 µg/mL을 나타내었으며 6 h 가열결과물에서 6.5±0.3 µg/mL의 IC₅₀ 값을 나타내었으며 이들 활성은 (+)-catechin과 비교하였을 경우에도 높은

Table 1. Comparison in DPPH radical scavenging activity of (+)-catechin by thermal processing

Concentration (µg/mL)	Inhibition (%) ¹⁾					IC ₅₀ (µg/mL)
	100	50	10	5	1	
(+)-Catechin ²⁾	92.0±1.7 ²⁾	90.6±1.2	56.7±1.0	34.5±0.7	7.9±0.3	8.4±0.4
(+)-Catechin 1h reactant	93.8±1.8	93.3±1.6	54.4±1.1	42.0±1.0	10.9±0.4	7.4±0.5
(+)-Catechin 2h reactant	93.2±1.7	91.1±1.5	55.5±1.2	34.9±0.8	4.1±0.2	8.5±0.4
(+)-Catechin 3h reactant	93.0±1.7	92.3±1.6	66.6±1.2	41.9±1.1	8.4±0.5	6.3±0.4
(+)-Catechin 6h reactant	92.2±1.6	91.5±1.5	62.9±1.0	44.1±0.8	6.3±0.3	6.5±0.3
(+)-Catechin 12h reactant	91.6±1.6	88.4±1.5	45.5±1.2	24.5±0.7	1.7±0.2	11.9±0.7
Compound (1)	92.7±1.5	91.8±1.5	61.4±1.1	39.3±0.8	10.0±0.6	7.1±0.3
Compound (2)	90.2±1.4	81.0±1.2	52.2±1.0	38.2±0.7	13.9±0.5	15.6±1.3

¹⁾Data represent the mean±SD thee replications.

²⁾Used as a positive control.

활성을 나타냄을 확인하였다. (+)-Catechin의 3 h 가열결과물에서 분리한 화합물(1)의 경우 $7.1 \pm 0.3 \mu\text{g/mL}$ 의 IC_{50} 값을 나타내었으며 이 활성 역시 (+)-catechin과 비교하였을 경우 다소 강한활성을 나타냄을 확인하였고, (+)-catechin의 3 h 가열결과물의 활성 상승과 관련된 물질임을 추정할 수 있었다. 또한 (+)-epicatechin과 함께 분리한 화합물(2)는 IC_{50} 값이 $15.6 \pm 1.3 \mu\text{g/mL}$ 을 나타내었다.

ABTS⁺ 라디칼 소거능 측정

7 mM ABTS와 2.45 mM $\text{K}_2\text{O}_8\text{S}_2$ 동량을 혼합한 후, 실온, 암소에서 16시간 방치하여 라디칼의 생성을 유도한 후, ABTS⁺ 라디칼 소거능을 측정하였다. 그 결과 Table 2에서 보는 것처럼 (+)-catechin을 121°C에서 0, 1, 2, 3, 6, 12 h 동안 가열처리한 결과물에 대하여 ABTS⁺ 라디칼 소거능을 평가한 결과, DPPH 라디칼 소거능의 평가 결과와 동일한 (+)-catechin의 3 h 가열결과물에서 가장 강한 활성인 $1.8 \pm 0.1 \mu\text{g/mL}$ 의 IC_{50} 값을 나타내었으며, (+)-catechin의 1 h 반응 결과물에서는 IC_{50} 값이 $2.1 \pm 0.1 \mu\text{g/mL}$, 2 h 반응 결과물에서 $2.3 \pm 0.1 \mu\text{g/mL}$ 의 활성을 나타내었다. 이들 활성은 (+)-catechin과 비교하였을 경우에도 비슷한 활성을 나타냄을 확인하였고 3 h 반응결과물에서 분리한 화합물인 (+)-epicatechin의 IC_{50} 값은 $3.2 \pm 0.2 \mu\text{g/mL}$, protocatechuic acid의 IC_{50} 값은 $3.1 \pm 0.1 \mu\text{g/mL}$ 로서 (+)-catechin의 IC_{50} 값과 비교하였을 경우 동등한 활성을 나타냄을 확인하였다.

Pancreatic lipase 저해활성

최근 비만은 당뇨, 암, 심장병 및 뇌졸중 등의 질병과 밀접한 연관성이 알려져 있어 비만의 예방 및 치료와 관련된 소재 개발의 필요성이 강조되어 지고 있는 실정이다. 시판중인 비만치료제로서 orlistat(상품명: Xenical)은 triglyceride를 분해하는 췌장의 지방분해 효소인 lipase에 비가역적인 결합을 하여 불활성화 시킴으로서 triglyceride 및 cholesterol의 흡수를 감소시킴과 동시에 배설 시키는 기작

으로 항비만 작용을 하지만 복부고통, 설사 등의 부작용이 문제시되고 있어(29), 이들 부작용이 없는 천연 항비만 소재 개발을 위한 연구가 활발하게 이루어지고 있다(20). 생물전환을 통한 항비만 선도물질개발을 목표로 하여 (+)-catechin을 121°C에서 0, 1, 2, 3, 6, 12 h 동안 가열처리하여 각각의 결과물에 대하여 pancreatic lipase를 이용하여 항비만 활성을 평가하였다. 그 결과 (+)-catechin의 6 h 반응물의 지방분해효소에 대한 저해능은 500 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 $60.6 \pm 1.1\%$ 의 강한 저해활성을 나타내었으며, 3 h 반응물의 경우, 500 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 $55.9 \pm 1.0\%$ 저해능을 확인하였다. (+)-Catechin의 IC_{50} 값인 $490.1 \pm 12.3 \mu\text{g/mL}$ 과 비교하였을 경우 가장 강한 항산화 활성을 나타낸 3 h 반응물의 IC_{50} 값이 $377.1 \pm 11.1 \mu\text{g/mL}$ 임을 확인하였고, (+)-catechin의 가열처리에 의해서 생성되는 (+)-epicatechin 및 protocatechuic acid 이외에 pancreatic lipase 저해활성을 나타내는 물질의 존재가 시사되었다.

최근 비만관련 천연선도 물질 개발을 위해 pancreatic lipase 저해 효능이 주요한 지표로서 활용되어 지고 있으며, 이 효소를 강력하게 저해하는 천연 물질개발과 관련하여 대황(*Eisinia bicylis*)로부터 7-phloroecokol (IC_{50} , 12.7 μM), 잔디(*Erenmochloa ophiuroides*)로부터 isoorientin 2-O-rhamnoside (IC_{50} , 18.5 μM), 닥나무(*Broussonetia kanzinoki*)로부터 broussonone A (IC_{50} , 28.4 μM)를 분리 및 동정하였으며(30-31), 무환자나무(*Sapindys rarak*)로부터 분리된 사포닌, 사과와 procyanidin류 및 인삼 ginsenoside류에서도 강한 pancreatic lipase 저해능이 확인되었다(32, 33). 본 연구에서 확인된 (+)-catechin의 가열산물 중 pancreatic lipase 저해활성을 나타내는 물질의 동정이 필요하다고 사료되며, 현재 활성유도 분획법(activity-guided isolation)을 활용한 물질의 분리 및 동정을 통하여 활성물질을 추적 및 분리하는 연구를 수행 중에 있다.

Table 2. Comparison in ABTS⁺ radical scavenging activity of (+)-catechin by thermal processing

Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Inhibition (%) ¹⁾					IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
	100	50	10	5	1	
(+)-Catechin ²⁾	-	99.6 ± 1.7	92.2 ± 1.6	81.1 ± 1.6	24.7 ± 0.5	1.9 ± 0.1
(+)-Catechin 1h reactant	99.8 ± 1.8	99.7 ± 1.7	92.9 ± 1.6	80.2 ± 1.3	22.1 ± 0.6	2.1 ± 0.1
(+)-Catechin 2h reactant	99.9 ± 1.7	99.8 ± 1.6	95.1 ± 1.4	77.1 ± 0.1	19.4 ± 0.3	2.3 ± 0.1
(+)-Catechin 3h reactant	99.8 ± 1.6	99.7 ± 1.6	95.1 ± 1.6	83.3 ± 1.5	18.5 ± 0.3	1.8 ± 0.1
(+)-Catechin 6h reactant	99.7 ± 1.7	99.6 ± 1.5	94.7 ± 1.4	71.2 ± 1.2	17.3 ± 0.3	2.5 ± 0.4
(+)-Catechin 12h reactant	99.7 ± 1.7	99.5 ± 1.6	91.7 ± 1.2	59.9 ± 1.0	12.4 ± 0.2	3.6 ± 0.4
Compound (1)	99.9 ± 1.6	99.8 ± 1.5	75.5 ± 1.2	61.4 ± 0.9	21.0 ± 0.4	3.2 ± 0.2
Compound (2)	99.2 ± 1.5	98.9 ± 1.6	83.5 ± 1.5	63.1 ± 1.0	17.4 ± 0.5	3.1 ± 0.1

¹⁾Data represent the mean \pm SD three replications.

²⁾Used as a positive control.

Table 3. Comparison in pancreatic lipase inhibitory activity of (+)-catechin by thermal processing

Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Inhibition (%) ¹⁾					IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)
	1000	500	250	125	62.5	
(+)-Catechin ²⁾	63.8 \pm 0.8	45.9 \pm 0.6	42.9 \pm 0.6	39.6 \pm 0.5	36.2 \pm 0.5	490.1 \pm 12.3
(+)-Catechin 1h reactant	51.6 \pm 0.7	38.8 \pm 0.6	28.8 \pm 0.3	20.7 \pm 0.3	15.2 \pm 0.3	>500
(+)-Catechin 2h reactant	68.9 \pm 1.0	47.8 \pm 0.8	34.0 \pm 0.6	26.7 \pm 0.5	20.5 \pm 0.3	>500
(+)-Catechin 3h reactant	61.2 \pm 1.1	55.9 \pm 1.0	44.5 \pm 0.8	30.3 \pm 0.7	23.8 \pm 0.5	377.1 \pm 11.1
(+)-Catechin 6h reactant	72.4 \pm 1.2	60.6 \pm 1.1	39.9 \pm 0.8	31.0 \pm 0.7	28.3 \pm 0.4	452.1 \pm 13.6
(+)-Catechin 12h reactant	56.0 \pm 1.1	45.3 \pm 1.0	34.8 \pm 0.7	30.1 \pm 0.6	25.9 \pm 0.3	>500
Compound (1)	45.4 \pm 0.7	42.1 \pm 0.7	33.5 \pm 0.5	30.2 \pm 0.4	25.8 \pm 0.4	>500
Compound (2)	53.2 \pm 1.0	43.8 \pm 0.9	35.0 \pm 0.8	31.0 \pm 0.6	16.6 \pm 0.5	>500
Orlistat ^b	99.8 \pm 1.5	99.8 \pm 1.5	97.2 \pm 1.6	94.2 \pm 1.8	91.1 \pm 0.1	0.2 \pm 0.1

¹⁾Data represent the mean \pm SD three replications.

²⁾Used as a positive control.

활성물질 분리 및 HPLC 분석

화합물 1은 백색의 분말상 물질로서 분리되었으며, $[\alpha]_D^{20} +51.5^\circ$ (c 0.2, MeOH)의 광학활성치와 FeCl_3 시액에 의하여 양성인 정색반응을 확인하였다. $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼에서 flavonoid A-ring 유래의 δ_{H} 6.00(1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-6), 5.89 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-8)의 시그널이 확인되었고, B-ring 유래의 전형적인 ABX 형태의 시그널이 δ_{H} 7.02(1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-2'), 6.80(1H, dd, $J = 8.4, 1.8$ Hz, H-6'), 6.77 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5')에서 관찰되었으며, C-ring 유래의 δ_{H} 4.83 (1H, m, H-2), 4.17(1H, m, H-3)의 oxymethine proton 및 methylene proton이 δ_{H} 2.81(1H, dd, $J = 16.8, 4.6$ Hz, H-4a), 2.68(1H, dd, $J = 16.8, 3.0$ Hz, H-4b)에서 관찰되었다. 이상의 분광학적결과는 Taniguchi 등(34)의 결과와 일치하

였으며, 표준품과 HPLC 직접 비교를 통하여 화합물 1을 (+)-epicatechin으로 동정하였다.

화합물 2는 백색의 분말상으로서 분리되었으며 FeCl_3 시액에 의하여 양성인 정색반응을 확인하였다. $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼에서 δ_{H} 7.48(1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-2), 7.34(1H, dd, $J = 8.4$ Hz, 1.8 Hz, H-6), 6.71(1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5)에서 벤젠 유래의 전형적인 ABX-type의 시그널이 확인되었으며 FAB MS를 활용한 기기분석을 통하여 분자량을 확인하였다. 이상의 분광학적결과는 Yamanaka 등(35)의 결과와 일치하였으며 표준품과 HPLC 직접 비교를 통하여 화합물 2를 protocatechuic acid로 동정하였다.

(+)-Catechin의 가열처리물에 존재하는 화합물과 활성과 의 상관관계를 평가하기 위하여 분리 및 동정된 화합물인

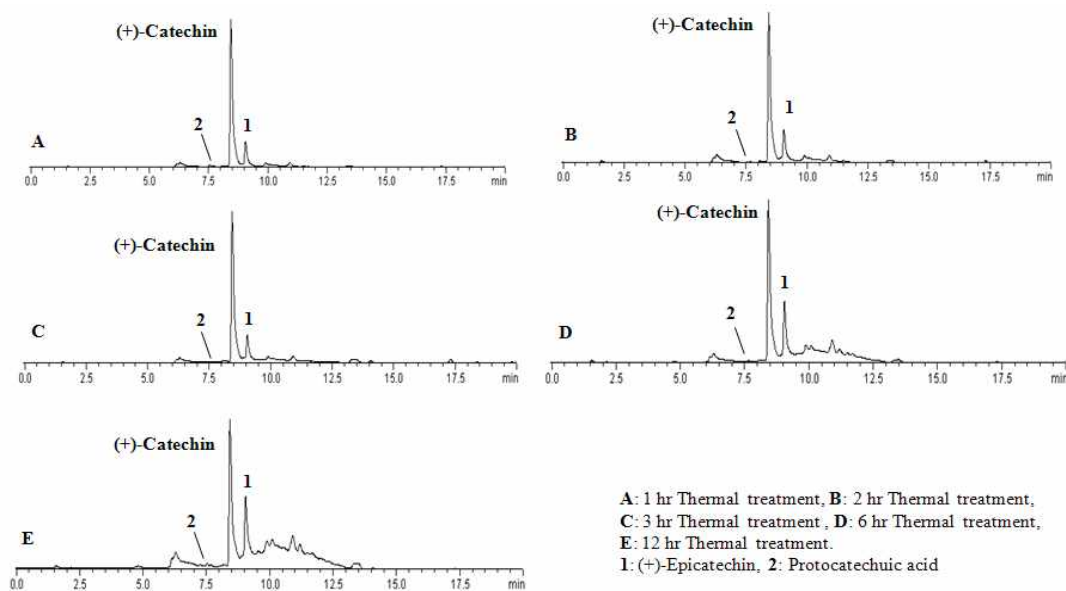


Fig. 2. HPLC chromatograms of thermal treatment (+)-catechin among different heating times. 1, (+)-Epicatechin; 2, Protocatechuic acid.

Table 4. The relative amounts of individual component in different reactants

Compounds	1 h		2 h		3 h		6 h		12 h	
	Time (min)	Content (%)	Time (min)	Content (%)	Time (min)	Content (%)	Time (min)	Content (%)	Time (min)	Content (%)
(+)-Catechin	8.448	83.0	8.437	79.1	8.448	77.0	8.434	73.6	8.435	66.7
(+)-Epicatechin (1)	9.064	15.5	9.060	19.4	9.062	21.5	9.056	20.1	9.058	20.5
Protocatechuic acid (2)	7.616	1.5	7.614	1.5	7.615	1.5	7.613	1.5	7.614	1.6
Unidentified	-	-	-	-	-	-	10.907	3.8	10.906	11.2

(+)-epicatechin 및 protocatechuic acid를 표준물질로 HPLC 분석을 실시하여 상대함량을 평가하였다. (+)-Catechin을 121°C에서 1, 2, 3, 6, 12 h 동안 가열처리한 처리군의 HPLC 크로마토그램을 분석한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. HPLC 분석결과 (+)-epicatechin의 상대함량은 가열시간이 3 h에서 극대치를 나타내었고 6 h 이상의 가열에서는 (+)-epicatechin 및 protocatechuic acid 이외의 미지의 물질이 생성되는 것을 확인하였고 protocatechuic acid의 함량은 가열 시간과 상관 없이 일정한 함량을 나타내는 것을 확인하였다.

요 약

(+)-Catechin을 121°C에서 0, 1, 2, 3, 6, 12 h 동안 가열처리하여 각각의 결과물에 대하여 DPPH 및 ABTS⁺ radical 소거능 및 pancreatic lipase 저해활성을 평가하였다. DPPH 라디칼 소거능은 (+)-catechin의 3 h 가열결과물에서 가장 강한 활성인 6.3±0.4 µg/mL의 IC₅₀값을 나타내었으며 6 h 가열결과물에서 6.5±0.3 µg/mL의 IC₅₀ 값을 나타내었으며, 이들 활성은 (+)-catechin과 비교하였을 경우에도 높은 활성을 나타냄을 확인하였다. 또한 ABTS⁺ 라디칼 소거능은 (+)-catechin의 3 h 가열결과물에서 가장 강한 활성인 1.8±0.1 µg/mL의 IC₅₀값을 나타내었으며, 3 h 가열반응물로부터 분리한 화합물 중 화합물(1)과 화합물(2)가 이들 활성에 관여함을 시사하였다. 항비만 활성평가에 활용되고 있는 pancreatic lipase를 이용한 효능 평가에서 3 h 반응물의 IC₅₀값이 377.1±11.1 µg/mL임을 확인하였고, 가열처리군별 HPLC 크로마토그램 및 상대함량으로 부터 (+)-catechin의 가열처리에 의해서 생성됨을 물질분리를 통해 구조결정한 (+)-epicatechin 및 protocatechuic acid 이외에 pancreatic lipase 저해활성을 나타내는 물질의 존재가 시사되었다. 향후 식품 및 음료에 광범위하게 존재하는 (+)-catechin의 가열조건에 따른 활성변화에 대한 보다 다양한 조건에서의 체계적인 연구가 필요하며 본 연구결과는 화합물의 구조변환을 통한 활성물질 개발을 위한 기초자료로 이용될 수 있을 뿐만 아니라 단일물질의 화학적 변화와 관련된 성분연구에 대한 기초자료로 활용가능하리라 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2011년도 대구한의대학교 기린연구비지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Skrzydlewska E, Ostrowska J, Farbiszewski R, Michalak K (2002) Protective effect of green tea against lipid peroxidation in the rat liver, blood serum and the brain. *Phytomedicine*, 9, 232-238
2. Yokozawa T, Nakagawa T, Kitani K (2002) Antioxidative activity of green tea polyphenol in cholesterol-fed rats. *J Agric Food Chem*, 50, 3549-3552
3. Rahman I, Biswas SK, Kirkham PA (2006) Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. *Biochem Pharmacol*, 72, 1439-1452
4. Ferrándiz ML, Alcaraz MJ (1991) Anti-inflammatory activity and inhibition of arachidonic acid metabolism by flavonoids. *Agents Actions* 32, 283-288
5. Sabu MC, Smitha K, Kuttan R (2002) Anti-diabetic activity of green tea polyphenols and their role in reducing oxidative stress in experimental diabetes. *J Ethnopharmacol*, 83, 109-116
6. Hollman PC, Arts IC (2000) Flavonols, flavones and flavanols—nature, occurrence and dietary burden. *J Sci Food Agric* 80, 1081-1093
7. Hou WC, Lin RD, Chen CT, Lee MH (2005) Monoamine oxidase B (MAO-B) inhibition by active principles from *Uncaria rhynchophylla*. *J Ethnopharmacol*, 100, 216-220
8. Natsume M, Osakabe N, Yamagishi M, Takizawa T, Nakamura T, Miyatake H, Hatano T, Yoshida T (2000) Analyses of polyphenols in cacao liquor, cocoa, and chocolate by normal-phase and reversed-phase HPLC. *Biosci Biotechnol Biochem*, 64, 2581-2587
9. Donovan JL, Crespy V, Manach C, Morand C, Besson

- C, Scalbert A, Rémésy C (2001) Catechin is metabolized by both the small intestine and liver of rats. *J Nutr*, 131, 1753-1757
10. Ahmad S (1995) Oxidative stress and antioxidant defenses in biology. Chapman & Hall, New York, USA, p 240-272
 11. Halliwell B (1991) Drug antioxidant effects. *Drugs*, 42, 569-605
 12. Shim JS, Kim SD, Kim TS, Kim KN (2005) Biological activities of flavonoid glycosides isolated from *Angelica keiskei*. *Korean J Food Sci Technol*, 37, 78-83
 13. Branen AL (1975) Toxicology and biochemistry of butylated hydroxy anisole and butylated hydroxytoluene. *J Oil Chem Soc*, 52, 59-62
 14. Masaki H, Sakaki S, Atsumi T, Sakurai H (1995) Active-oxygen scavenging activity of plants extracts. *Biol Pharm Bull*, 18, 162-166
 15. Bitou N, Nimomiya M, Tsujita T, Okuda H (1999) Screening of lipase inhibitors from marine algae. *Lipids*, 34, 441-445
 16. Drent ML, Larsson I, William-Olsson T, Quaade F, Czubayko F, Von Bergmann K, Strobel W, Sjostrom L, Van der Veen EA (1995) Orlistat (RO 18-0647), a lipase inhibitor, in the treatment of human obesity: a multiple dose study. *Int J Obesity*, 19, 221-226
 17. Hadvary P, Lengsfeld H, Wolfer H (1988) Inhibition of pancreatic lipase in vitro by covalent inhibitor tetrahydrolipstatin. *Biochem J*, 256, 357-361
 18. Peter C, Williams G (2001) Drug treatment of obesity: from past failures to future successes? *Br J Clin Pharmacol*, 51, 135-141
 19. Yamamoto M, Shimura S, Itoh M, Egawa M, S Ionue, Ohsaka T (2000) Anti-obesity effects of lipase inhibitor CT-II, an extract from edible herbs, *Nomame Herba*, on rats fed a high-fat diet. *Int J Obesity*, 24, 758-764
 20. Birari RB, Bhutani KK (2007) Pancreatic lipase inhibitors from natural sources: unexplored potential. *Drug Discov Today*, 12, 879-889
 21. Lee EM, Lee SS, Chung BY, Cho JY, Lee IC, Ahn SR, Jang SJ, Kim TH (2010) Pancreatic lipase inhibition by C-glucosidic flavones isolated from *Eremochloa ophiuroides*. *Molecules*, 15, 8251-8259
 22. Hong JY, Shin SR, Bae MJ, Bae JS, Lee IC, Kwon OJ, Jung JW, Kim YH, Kim TH (2010) Pancreatic lipase inhibitors isolated from the leaves of cultivated mountain ginseng (*Panax ginseng*). *Korean J Food Preserv*, 17, 727-732
 23. Kim TH, Kim JK, Ito H, Jo C (2011) Enhancement of pancreatic lipase inhibitory activity of curcumin by radiolytic transformation. *Bioorg Med Chem Lett*, 21, 1512-1514
 24. Park CH, Chung BY, Lee SS, Bai HW, Cho JY, Jo C, Kim TH (2013) Radiolytic transformation of rotenone with potential anti-adipogenic activity. *Bioorg Med Chem Lett*, 23, 1099-1103
 25. Blois MS (1958) Antioxidant activity determination by the use of a stable free radical. *Nature*, 181, 1199-1200
 26. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C (1999) Antioxidant activity applying and improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biol Med*, 26, 1231-1237
 27. Kim JH, Kim HJ, Park HW, Youn SH, Choi DY, Shin CS (2007) Development of inhibitors against lipase and alpha-glucosidase from derivatives of monascus pigment. *FEMS Microbiol Lett*, 276, 93-98
 28. Torel J, Cillard J, Cillard P (1986) Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxy radical. *Phytochemistry*, 25, 383-385
 29. Cooke D, Bloom S (2006) The obesity pipeline: current strategies in the development of anti-obesity drugs. *Nat Rev Drug Discov*, 5, 919-931
 30. Eom SH, Lee MS, Lee EW, Kim YM, Kim TH (2013) Pancreatic lipase inhibitor activity of phlorotannins isolated from *Eisenia bicyclis*. *Phytother Res*, 27, 148-151
 31. Ahn JH, Liu Q, Lee C, Ahn MJ, Yoo HS, Hwang BY (2012) A new pancreatic lipase inhibitor from *Broussonetia kanzinoki*. *Bioorg Med Chem Lett*, 22, 2760-2763
 32. Sugiyama H, Akazome Y, Shoji T, Yamaguchi A, Yasue M, Kanda T, Ohtake Y (2007) Oligomeric procyanidins in apple polyphenol are main active components for inhibition of pancreatic lipase and triglyceride absorption. *J Agric Food Chem*, 55, 4604-4609
 33. Liu W, Zheng Y, Han L, Wang H, Saito M, Ling M, Kimura Y, Feng Y (2008) Saponins (ginsenosides) from stems and leaves of *Panax quinquefolium* prevented high-fat diet induced obesity in mice. *Phytomedicine*, 15, 1140-1145
 34. Taniguchi S, Kuroda K, Doi K, Inada K, Yoshikado N, Yoneda Y, Tanabe M, Shinata T, Yoshida T, Hatano T (2007) Evaluation of gambir quality based on quantitative analysis of polyphenolic constituents. *Yakugaku Zasshi*, 127, 1291-1300

35. Yamanaka M, Shimomura K, Sasaki K, Yoshihira K,
and Ishimaru K (1995) Glucosylation of phenolics by

hair root cultures of *Lobelia sessilifolia*. *Phytochemistry*,
40, 1149-1150

(접수 2013년 2월 14일 수정 2013년 4월 5일 채택 2013년 4월 12일)